

Dryopterin, ein neuartiges C₁₇-Flavan aus *Dryopteris filix-mas*

Dryopterin, a Novel C₁₇-Flavan from *Dryopteris filix-mas*

Christian Karl, Peter Alsted Pedersen und Gerhard Müller

Weleda AG, D-7070 Schwäbisch Gmünd

Z. Naturforsch. **36 c**, 607–610 (1981); received April 6, 1981

Dryopteris filix-mas (L.) Schott, Polypodiaceae, Flavan, Dihydrocoumarin, Lactone

From acetone extracts of fresh aerial parts of *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott a flavan-3-ol was isolated. Its structure was elucidated as 5-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,3a,4,5-tetrahydro-4,8-dihydroxy-2H-pyrano[4,3,2-de]-1-benzopyran-2-one by means of spectroscopic methods including ¹³C-NMR.

In den getrockneten Wedeln von *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott wurden bis heute folgende phenolische Inhaltsstoffe gefunden: Chlorogensäure [1], Zimtsäurederivate [2], Shikimisäure [3], Cyanidin [4], Leukoanthocyane [5], Kämpferol, Quercetin und andere Flavonoid-Aglyka [5]. Da jedoch die zum Nachweis dieser Stoffe verwendeten Methoden [2, 4, 5] zur Bildung von Artefakten führen, hatten wir uns mit der vorliegenden Arbeit vorgenommen, die oberirdischen Teile des Wurmfarns erneut auf Polyphenole zu untersuchen. Dabei konnte ein Naturstoff neuen Typs isoliert und in seiner Konstitution aufgeklärt werden, der Strukturelemente eines Flavans und eines Dihydrocoumarins in sich vereinigt.

Ergebnisse und Diskussion

Zunächst gingen wir der Frage nach, ob die relativ toxischen Phloroglucide des Rhizoms auch in den Wedeln vorkommen. Es wurden die gleichen Phloroglucide isoliert. Auch die relative Zusammensetzung des als Filicin bezeichneten Gemisches war die gleiche, mengenmäßig betrug es aber nur etwa ein Zwölftel des Rhizom-Filicins.

Aus frischen und rasch aufgearbeiteten Wedeln wurde neben Kämpferol-3-O-glucosid, Quercetin-3-O-glucosid, Epicatechin und Procyanidin B2 eine weitere, sehr gut wasserlösliche Substanz (**I**) in farblosen Kristallen isoliert, die sich chemisch wie ein Catechin verhielt. Die rasche Aufarbeitung war notwendig, da sich **I** im Pflanzenansatz zersetzte; als Reinsubstanz war sie dagegen auch in Lösung relativ stabil.

Im IR-Spektrum zeigte **I** eine deutliche Bande bei 1710 cm⁻¹, charakteristisch für einen Ester oder ein Lacton. Hochaufgelöste MS ergab für den Molekülpeak eine Masse von 330,073, der Summenformel C₁₇H₁₄O₇ entsprechend. Mit verschiedenen Alkoholen in Gegenwart von Spuren Mineralsäure ließ sich **I** zu jeweils chromatographisch verschiedenen Produkten umsetzen; mit Methanol wurde eine Substanz mit dem Molekulargewicht 362 gewonnen. Demnach war **I** ein Lacton.

Das PMR-Spektrum (Tab. I) war dem des Catechin ähnlich. Es wies Signale zweier Benzolringe auf, deren Kopplungen und chemische Verschiebungen mit einer Substitution eines 5.7.3'.4'-Tetrahydroxyflavans übereinstimmten. Auffällig war, daß die beiden Dubletten bei 6,05 und 5,94 ppm nach Einengen der Lösung mit D₂O verschwanden, d.h. Protonen gegen D ausgetauscht wurden. Dies konnte jedoch auch bei Epicatechin beobachtet werden. Die Signale bei 2,43, 3,06 und 3,41 ppm bilden ein ABC-System, wie Einstrahlungsversuche bestätigten, wobei erstere geminale Protonen sein mußten ($|J| = 16$ Hz). Die Perturbation des Singletts bei 4,02 ppm war nach Einstrahlungsversuchen (auf 2,43, 3,41, 6,9 ppm) am ehesten durch eine Kopplung mit dem Proton bei 3,41 ppm zu erklären.

Das ¹³C-NMR-Spektrum in DMSO wies im Vergleich mit den Daten für Epicatechin [6] leichte Verschiebungen der Signale für C-2 (–4,2 ppm), C-3 (+2,9 ppm), C-4 (+7,1 ppm, falls dieses bei 36,0 ppm lag) und C-10 (+2,9 ppm) auf. In diesem Spektrum, das wie oben nach Einengen mit D₂O aufgenommen war, fehlten im Gegensatz zu dem davor in Aceton registrierten Spektrum (Tab. II) deutliche Signale bei 96,6 und 95,8 ppm, an welche C-Atome demnach die ausgetauschten Protonen gebunden sein

Sonderdruckerfordernungen an Dr. Ch. Karl.

0341-0382/81/0700-0607 \$ 01.00/0



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

Tab. I. PMR-Daten von Dryopterin (**I**), sein Acetat (**II**) und sein Methylesteracetat (**III**) (δ ppm (J_{Hz}))^a.

Subst.	Aromat. Protonen						MeO-Acetyl	
	A-Ring	B-Ring	H-2 ^b	H-3	H-4	H-11	arom.	aliph.
I	6,05 d (2) 5,94 d (2)	7,08 – 6,84 m	4,93 s	4,02 p.	3,41 ^c m	3,06 ^c dd (3,7, 16) 2,43 ^c dd (11, 16)		
II	6,59 d (2) 6,51 d (2)	7,19 – 7,02	5,28 s	5,52 d (5)	5,2 m	3,1 – 2,4 m	2,29 – 2,26 3 s	2,14 s
III	6,68 d (2) 6,63 d (2)	7,33 – 7,23 m	5,20 p.	5,24 ^c m	3,41 ^c m	2,84 dd (3½, 15) 2,45 dd (10, 15)	3,78 s 2,32 s (9 H) 2,28 s (3 H)	1,85 s

^a **I** in Aceton, Acetate in CDCl₃;^b Bezifferung, siehe Formal **I**.^c Die Zuordnung der Signale erfolgte durch Einstrahlungsversuche;

p.: ein perturbiertes Singlett.

mußten. Die Zuordnung der C-Atome des B-Ringes wurde aufgrund eines nicht entkoppelten Spektrums (116,5 ppm, $^1J_{\text{CH}} = 158$, $^3J_{\text{CH}} = 4$; 118,2 ppm, $^1J_{\text{CH}} = 159$; 121,1 ppm, $^1J_{\text{CH}} = 160$, $^3J_{\text{CH}} = 6$) und in Übereinstimmung mit Inkrementberechnungen anders als in [6] vorgenommen. Gegenüber dem Epicatechin-Spektrum enthielt das Spektrum von **I** noch ein Signal bei 177,9 ppm, einem Ester-Carbonyl-C entsprechend, und eines bei 39,1 ppm. Nach diesen und den MS-Daten enthielt **I** eine C=O-Gruppe eines Lactons und ein C-Atom mehr als Catechin.

Das Peracetat von **I** (**II**) ergab im Massenspektrum einen Molekülpeak bei m/e 498; der Massenabbau begann mit der Abspaltung von 4 Acetylgruppen. Das PMR-Spektrum (Tab. I) zeigte, daß es sich dabei um 3 aromatische und eine aliphatische handelte. Das Peracetat des Methylesters (**III**) war nach dem PMR-Spektrum erwartungsgemäß ein Pentaacetat und zwar mit 4 aromatischen und einer

aliphatischen Acetylgruppe. Daraus folgte, daß das Lacton in **I** ein intramolekularer Phenolester sein mußte.

Das PMR-Spektrum von **III** (Tab. I) zeigte außerdem gegenüber dem von **I** ein unverändertes ABC-System, aber Verschiebungen der übrigen Methin-Protonen auf 5,20 bzw. 5,24 ppm. Aufgrund dieser Tatsache wurde das Singlett bei 4,93 ppm in **I** einem Proton zugeordnet, das vicinal zu einer C–OH-Gruppierung sein mußte. Das Signal bei 4,02 ppm in **I** war in **III** um 1,2 ppm verschoben, was für eine Acetylierung einer OH-Gruppe am selben C-Atom spricht. Das Spektrum von **II** stimmte mit dieser Annahme überein. Die Aufspaltung des perturbierten Singletts bei 4,02 ppm in Spektrum von **I** in ein Dublett in **II** und ein Multiplett in **III** war nach einem Einstrahlungsversuch mit **III** auf 3,41 ppm durch Kopplung mit diesem Proton des erwähnten ABC-Systems zu erklären. Also mußte **I** das Struk-

Tab. II. ¹³C-NMR-Daten von Dryopterin (**I**) und sein Ester-Acetat (**III**) (δ ppm)^{*}.

	C-2 ⁺	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
I	75,4	70,2	36,0	157,9 ^a	96,6 ^b	157,9 ^a	95,8 ^b	156,9 ^a
III	72,9 ^a	69,1 ^a	33,2 ^b	150,2 ^c	109,4	149,9 ^c	108,0	154,6

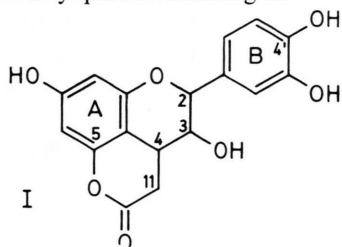
Tab. II. (Fortsetzung).

	C-10	C-11	C-12	C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'
I	102,7	39,1	174,0	132,1	115,3 ^c	145,2 ^d	145,4 ^d	115,6 ^c	119,3
III	111,9	39,6	171,0	135,5	122,1 ^d	142,1 ^e	142,0 ^e	123,3 ^d	124,4 ^d

^a, ^b, ^c, ^d, ^e Zuordnungen mit denselben Buchstaben sind austauschbar.^{*} **I** in Aceton, Acetat in CDCl₃.⁺ Bezifferung, siehe Formel **I**.

turelement $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{C}(\text{OH})\text{H}-$ enthalten. Die unterschiedlichen chemischen Verschiebungen der beiden Protonen in **II** und **III** wären durch sterische Unterschiede zwischen beiden Substanzen – hervorgerufen durch die Öffnung des Lactonringes – erklärbar.

Obiges Strukturelement könnte Bestandteil des C-Ringes eines Isoflavans sein, jedoch liegen die chemischen Verschiebungen der geminalen Protonen dort bei etwa 4,5 ppm. Es ist deshalb in einer Substanz mit den wie genannt substituierten Benzolringen, einem Lactonring und 17 C-Atomen nur mit der Struktur **I** zu vereinbaren, für die wir den Namen Dryopterin vorschlagen:



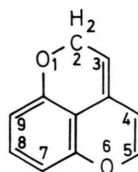
Auch die MS-Daten sind damit vereinbar, indem der Massenabbau dem von Flavan-3-olen [7] entspricht: Es dominierten das (RDA+H)-Fragment des A-Ringes (mit Lactonring) (*m/e* 179) und das RDA-Fragment des B-Ringes (*m/e* 152).

Die endgültige Zuordnung der Signale bei 36,0 und 39,1 ppm im ¹³C-NMR-Spektrum von **I** erfolgte durch ein nicht entkoppeltes Spektrum. 39,1 ppm gab ein Triplett und war demnach C-11, 36,0 ppm ein Dublett und mußte C-4 sein.

Die Struktur **I** besitzt 3 chirale Zentren. Aus sterischen Gründen muß am C-4 das C-Atom des Lactonringes äquatorial angeordnet sein. Die fehlenden bzw. schwachen Kopplungen zwischen den Protonen in 2-, 3- und 4-Stellung in **I** und die stärkeren Kopplungen in den Spektren von **II** und **III** zeigen, daß diese Protonen in **I** jeweils Winkel von 90° miteinander bilden. In 3,4-substituierten Flavanolen wurden solche kleine Kopplungen nur in 2,3-*cis*-3,4-*trans* Verbindungen beobachtet [8], während große Kopplungskonstanten bei 2,3-*trans*-3,4-*trans*-Verbindungen [8] – auch für die Procyanidine [9] – charakteristisch sind. Bei **I** ist die große Veränderung der chemischen Verschiebung von H-4 bei Acetylierung (1,8 ppm) durch eine *cis*-Anordnung des H-4 zu der OH-Gruppe an C-3 zu erklären, nämlich durch den Anisotropie-Effekt der C=O-Gruppe, der bei einer *trans*-Anordnung wegen des größeren Abstandes

zwischen H-4 und der C=O-Gruppe kleiner sein müßte [10]. Auch der Unterschied in der chemischen Verschiebung von C-2 in Epicatechin-Acetat und **III** stimmt mit einer 2,4-*trans*-Anordnung überein [11]. Ferner ist erwähnenswert, daß unter den Procyanidinen keine Substanz mit einer *cis*-Anordnung zwischen der OH-Gruppe bei C-3 und der Arylgruppe bei C-4 gefunden wurde [11]. Da also sämtliche Befunde in dieselbe Richtung deuten, schlagen wir für **I** die folgende relative Konfiguration vor (bezogen auf die H-Atome): 2,3-*cis*-3,4-*trans*.

Nach Auskunft von Chemical Abstracts Service liegt der Struktur von **I** folgendes als 2H-Pyrano-[4.3.2-*de*]-1-benzopyran bezeichnetes Ringsystem zugrunde:



In Übereinstimmung mit den IUPAC- und CA-Nomenklatur-Empfehlungen folgt für **I** daraus die chemische Bezeichnung (ohne Berücksichtigung der sterischen Verhältnisse) 5-(3,4-Dihydroxyphenyl)-3,3a,4,5-tetrahydro-4,8-dihydroxy-2H-pyrano [4.3.2-*de*]-1-benzopyran-2-on.

Experimentelles

¹³C-NMR: vgl. [12]. PMR: Gerät wie ¹³C-NMR. Das hochaufgelöste MS wurde von der Fa. Analytische Laboratorien, D-5270 Gummersbach, aufgenommen: Spektrometer SM 1 B (Varian Mat), 70 eV, Auflösung: ca. 1000, Ionenquelle: 200°. Geräte im übrigen wie früher beschrieben [13].

Isolierung: 16 kg frische Wedel aus Anbau in Süddeutschland wurden 4 Tage mit 50 kg Aceton mazeriert. Das Mazerat wurde bei 40 °C im Rotavap zur Sirupdicke eingengt, mit Wasser versetzt und etwas Kieselgur zugegeben. Nach Filtration wurde mit CCl₄, CHCl₃, Diethylether und Ethylacetat extrahiert. Der Ethylacetat-Extrakt (19 g) wurde durch mehrfache Säulen-Chromatographie an Sephadex LH 20 mit Ethanol, Aceton und Chloroform/Methanol-Gemischen aufgetrennt. Als reine Substanzen wurden Kämpferol-3-O-glucosid, Quercetin-3-O-glucosid, Epicatechin und Procyanidin B2 isoliert, die mit den üblichen Methoden und anhand

von authentischen Substanzen identifiziert wurden. Daneben erhielten wir etwa 300 mg Dryopterin (**I**).

Chromatographie (DC): A Kieselgel, CHCl₃/HOAc/H₂O 55:45:10; B Kieselgel F₂₅₄, Toluol/Aceton/HCOOH 5:5:1; C Cellulose, *n*-BuOH/HOAc/H₂O 4:1:2; D Kieselgel F₂₅₄, Toluol/Aceton 2:1.

Dryopterin (I). Schmp. 118°. DC (*R_F*-Werte) A: 0,20; B: 0,35; C: 0,62, Detektion: Vanillin/HCl: karmin, FeCl₃: blauviolett, Echtblausalz B: karmin. $[\alpha]^{25} = -50,6^\circ \text{C}$ (*c* 2,7, MeOH), $[\alpha]^{20} = -36^\circ \text{C}$ (*c* 6,3, H₂O). UV λ_{max} nm: 281 (MeOH). IR γ_{max} cm⁻¹ (KBr): 3400, 1710, 1630, 1605, 1520, 1470, 1400, 1280, 1145, 1100, 1060, 1030, 830, 800. EI-MS *m/e* (rel. Intensität): 330 (34), 312 (0,9), 286 (4), 271 (4), 179 (70), 165 (3), 152 (100), 150 (11), 135 (6), 123 (43), 77 (7), 69 (11), 44 (53).

Dryopterin-Tetraacetat (II). 90 mg **I** wurden über P₂O₅ getrocknet und danach mit je 5 ml wasserfreiem Pyridin und Acetanhydrid 60 min im Trockenschrank auf 100 °C erhitzt. Die überschüssigen Reagenzien wurden durch mehrmaliges Einengen mit Toluol am Rotavap bei 40 °C entfernt. Der Rückstand wurde in wenig Toluol/Aceton 2:1 gelöst und auf eine kleine Kieselgel-Säule gebracht. Man eluierte mit demselben Gemisch und erhielt 48 mg **II**. Prüfung auf freie OH-Gruppen: negativ. DC (*R_F*-Wert): D 0,47 (Löschung). FD/FI-MS *m/e*: 498 (M⁺). EI-MS *m/e* (rel. Intensität): 498 (0,6 M⁺), 438 (15, M-HOAc), 396 (36), 312 (27), 203 (6), 194 (11), 179 (11), 152 (22), 123 (10), 57 (6), 43 (100).

Dryopterinmethylester. 76 mg **I** wurden in 10 ml wasserfreiem MeOH gelöst und mit 1 Tropfen konz.

H₂SO₄ versetzt. Nach zweitägigem Stehen bei Raumtemperatur war bei chromatographischer Überprüfung **I** völlig umgesetzt. Der Ansatz wurde darauf mit 10 ml H₂O verdünnt, mit BaCO₃ neutralisiert, filtriert und das Filtrat an etwas Seesand angetrocknet. Die Antrocknung gab man auf eine kleine Sephadex LH 20-Säule, die mit CHCl₃/MeOH 8:2 eingeschlämmt war, und eluierte mit dem gleichen Gemisch. Man erhielt 72 mg Dryopterinmethylester.

DC (*R_F*-Werte): A 0,34; B: 0,43; D: 0,05, Detektion: Vanillin/HCl: rot. FD/FI-MS *m/e* (rel. Intensität): 362 (7), 330 (100). EI-MS *m/e* (rel. Intensität): 362 (0,3 M⁺), 344 (0,4), übrige wie **I**.

Dryopterinmethylester-Pentaacetat (III). 92 mg Dryopterinmethylester wurden wie **I** mit Pyridin und Acetanhydrid umgesetzt. Nach zweimaliger SC-Reinigung über Kieselgel mit Toluol/Aceton 2:1 wurden 25 mg **III** erhalten.

DC (*R_F*-Werte): B: 0,55; D: 0,45 (Löschung).

Dank

Wir danken Herrn Dr. S. Brøgger Christensen, Dänische Pharmazeutische Hochschule, für wertvolle Diskussionen, sowie Herrn Dipl.-Ing. E. Larsen und Herrn H. Egsgaard, AEK Risø, für die Aufnahme der Massenspektren. Die NMR-Spektren wurden auf einem von „Statens Naturvidenskabelige Forskningsraad“ dem Chemischen Laboratorium II der Universität Kopenhagen zur Verfügung gestellten Gerät aufgenommen.

- [1] B. A. Bohm, *Phytochemistry* **7**, 1825 (1968).
- [2] A. D. M. Glass u. B. A. Bohm, *Phytochemistry* **8**, 629 (1969).
- [3] H. Kinzel u. A. Walland, *Z. Pflanzenphysiol.* **54**, 371 (1966).
- [4] A. Fredga u. G. Bendz, *Ann. Chem.* **691**, 177 (1961).
- [5] B. Voirin, *C. R. Acad. Sci., Ser. D* **264**, 665 (1967).
- [6] K. R. Markham u. B. Ternai, *Tetrahedron* **32**, 2607 (1976).
- [7] J. W. Clark-Lewis, *Aust. J. Chem.* **21**, 3025 (1968).
- [8] J. W. Clark-Lewis, *Aust. J. Chem.* **21**, 2059 (1968).

- [9] L. Y. Foo u. L. J. Porter, *J. Chem. Soc. Perkin I* **1977**, 1186.
- [10] H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, S. 75–82, Thieme Verlag, Stuttgart 1973.
- [11] A. C. Fletcher, L. J. Porter, E. Haslam u. R. K. Gupta, *J. Chem. Soc. Perkin I* **1977**, 1628.
- [12] C. Karl, P. A. Pedersen u. G. Müller, *Z. Naturforsch.* **35 c**, 826 (1980).
- [13] C. Karl, G. Müller u. P. A. Pedersen, *Planta Med.* **41**, 96 (1981).